



Guter Rat ist Roth.

Technische Info

Verwendung von Trypsin bei der Zellpassage / Subkultivierung von Zellen

Zellen in Kultur müssen regelmäßig passagiert (gesplittet, subkultiviert) werden. Im Falle von adhärenenten Zellen bedeutet dies, dass die Zellen von den Kulturgefäßen abgelöst und ein Teil dieser Zellen in neue Kulturgefäße mit frischem Kulturmedium überführt werden. Damit wird verhindert, dass die Zellen zu engen Zell-Zell-Kontakten ausgesetzt sind und durch die dabei entstehende Zellkontakthemmung ihre Zellteilungsrate verringern. Wie oft Zellen passagiert werden müssen, ist zelltypabhängig. Für gewöhnlich werden Zellen bei Standardkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) bei einer Konfluenz (Oberflächenbedeckung) von ca. 80% in neue Kulturgefäße überführt. Die Zelldissoziation oder Zellablösung von Kulturoberflächen mithilfe von Trypsin- oder Trypsin/EDTA-Lösungen ist bei weitem die gängigste Methode in der Routine Zellkultur.

Trypsin ist ein zu den Serinproteasen gehörendes Verdauungsenzym mit einem Molekulargewicht von 23,3 kDa, welches aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen gewonnen wird. Es entfaltet seine größte Aktivität bei einem pH-Optimum von 7,5-8,5 und einer Temperatur von 37 °C. *In vivo* wird Trypsin in der Bauchspeicheldrüse in Form des inaktiven Zymogens Trypsinogen gebildet. Nach Erreichen des Duodenums wird die Aktivierung des Trypsinogens zu Trypsin durch die Enteropeptidase katalysiert. Sobald kleine Mengen des Trypsins vorhanden sind, kommt es verstärkt zur Autoaktivierung des Trypsinogens durch das Trypsin, wodurch wiederum die Bildung von Trypsin beschleunigt wird. Die funktionelle Aufgabe des Trypsins ist die hydrolytische Spaltung von Proteinen und Peptiden. Dabei spaltet Trypsin an der C-terminalen Seite von Lysin- und Argininresten. Ausnahme sind hier die Sequenzen Lys-Pro und Arg-Pro, die nicht geschnitten werden. Auch greift Trypsin Peptidbindungen zwischen einer basischen (Lys, Arg) und einer sauren Aminosäure (Glu, Asp) nur langsam an.

Bei der **Trypsinierung** kommt es demnach zur Spaltung von Adhäsionsproteinen, durch welche sich die Zellen an der Oberfläche von Kulturgefäßen anhaften. Daneben bringt Trypsin allerdings auch unerwünschte Nebeneffekte mit sich, weshalb es wichtig ist, die Trypsinierung nach einer gewissen Zeit abzustoppen. Dafür wird ein Inhibitionsschritt oder auch Neutralisationsschritt angeschlossen. Die Trypsin-Inhibition erfolgt entweder durch FCS/FBS, sofern mit serumhaltigen Medien gearbeitet wird, oder mit Trypsin-Inhibitoren.

Trypsin wird in der Routine Zellkultur häufig in Kombination mit **EDTA** verwendet. EDTA ist ein Chelatbildner und verbessert die Fähigkeit von Trypsin, adhärenente Zellen abzulösen. EDTA bindet dabei Calcium und Magnesium, wodurch die Zell-Zell-Kontakte zusätzlich geschwächt werden. Dies begünstigt die Hydrolyse spezifischer Peptidbindungen durch das Trypsin.

Empfohlene Reagenzien von Carl Roth

ROTI@Cell Nährmedien	
ROTI@Cell Trypsin-Lösung (1x)	Best.-Nr. 1Y17
ROTI@Cell Trypsin-Lösung (10x)	Best.-Nr. 1Y16
ROTI@Cell Trypsin/EDTA-Lösung (1x)	Best.-Nr. 1Y1A
ROTI@Cell Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Best.-Nr. 1Y19
Trypsin-Inhibitor	Best.-Nr. 2949
ROTI@Cell DPBS (ohne Ca/Mg)	Best.-Nr. 9124
ROTI@Cell PBS	Best.-Nr. 9143
ROTI@Cell Wasser	Best.-Nr. 9186





Guter Rat ist Roth.

Technische Info

Gängiges Protokoll für die Zellpassage:

Die Trypsinierung muss unter der Laminar Flow bei sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Je nach Zelltyp, kann es Abweichungen bezüglich der Inkubationszeiten und der Trypsin-Konzentrationen geben. 10x Lösungen sollten zuvor auf eine 1x Lösung verdünnt werden.

1. Trypsin- oder Trypsin/EDTA-Lösung im Wasserbad bei +37 °C oder über Nacht bei +2 °C bis +8 °C auftauen. Durch leichtes Schwenken homogenisieren.
2. PBS / DPBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ und entsprechendes Zellkulturmedium (siehe empfohlene Reagenzien) bei Raumtemperatur aufwärmen lassen, sofern zuvor bei +4 °C gelagert.
3. Unter dem Lichtmikroskop überprüfen, ob die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht haben und einen vitalen Zustand ohne Kontaminationen aufweisen.
4. Vorsichtig das Medium in der Zellkulturflasche abpipettieren und dabei den Zellrasen weitestgehend unberührt lassen. **Tipp:** Die Zellkulturflasche schräg halten und das Medium nur aus einer Ecke des Gefäßes abnehmen.
5. Zellrasen mit PBS / DPBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ waschen (ca. 5 ml Salzlösung auf 25 cm²). **Tipp:** Die Salzlösung entlang der nicht bewachsenen Seite der Zellkulturflasche in das Gefäß hineinfließen lassen. Zellkulturflasche etwas schwenken, damit die Salzlösung den Zellrasen schonend wäscht. Anschließend Salzlösung vorsichtig abnehmen (siehe Tipp in 4.).
6. Erwärmte Trypsin- oder Trypsin/EDTA-Lösung in die Zellkulturflasche geben, sodass der Zellrasen komplett bedeckt ist (200 µl sind ausreichend bei 25 cm² Zellrasen).
7. Trypsin- oder Trypsin/EDTA-Lösung ca. 3 min auf dem Zellrasen inkubieren. Dafür das Zellkulturgefäß bei 37 °C in den Inkubator stellen. Für eine schonendere Behandlung, bei Raumtemperatur inkubieren mit verlängerter Inkubationszeit. Sobald die Zellen rundlich erscheinen und auf dem Flaschenboden schwimmen, kann die Trypsinierung abgestoppt werden. Unter dem Lichtmikroskop überprüfen, ob alle Zellen vom Boden gelöst sind. **Tipp:** Durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche lösen sich die Zellen deutlich schneller, sodass die Trypsinierung früher abgestoppt werden kann.
8. Trypsin inhibieren durch direkte Aufnahme der Zellen in frischem, serumhaltigen Zellkulturmedium (ca. 5 ml bei 25 cm² Zellrasen). Sofern nicht mit Serum (FCS/FBS) gearbeitet wird, erfolgt die Trypsin-Inhibition mittels einer Trypsin-Inhibitor-Lösung (1 mg/ml in Wasser oder PBS) im Verhältnis 1:1 mit der Trypsin-Lösung und anschließender Aufnahme in Zellkulturmedium. **Tipp:** Das frische Medium aus der Pipette mit etwas mehr Druck direkt über den zuvor bewachsenen Flaschenboden spülen, damit auch die letzten Zellen vom Gefäß abgelöst werden. Durch Wiederaufnahme der entstandenen Zellsuspension kann dieser Spül-Schritt wiederholt (ca. 3x) und damit der ganze Flaschenboden „abgespült“ werden. Dabei werden auch mögliche Zellklumpen gelöst.
9. Die Zellsuspension in ein frisches Falcon überführen und Zellen abzentrifugieren (5 min, 1000 U/min). **Tipp:** Während des Zentrifugationsschrittes neue Zellkulturflaschen oder auch well-Platten bereitstellen, beschriften und Medium vorlegen, sofern notwendig.
10. Nach der Zentrifugation, Überschuss abnehmen und Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendieren. Hierfür entsprechend viel Medium verwenden, damit die gewünschte Zelldichte erreicht wird. **Tipp:** Für Zellexperimente wird an dieser Stelle die Zellzahl über eine Neubauer-Zählkammer ermittelt (10 µl Zellsuspension in Zählkammer geben).
11. Zellsuspension kann anschließend in neue Zellkulturflaschen oder in well-Platten überführt werden. Um die entsprechende Zelldichte zu erreichen, kann hierzu Medium vorgelegt werden (siehe Tipp in Schritt 9). Mithilfe einer leichten Nord-, Süd-, Ost-, West-Bewegung der Zellkulturflasche auf dem Tisch der Laminar Flow, werden die Zellen gleichmäßig verteilt. **Achtung:** Die Zellsuspension sollte nicht in den Flaschenhals gelangen.

Hinweis: Zwischen den einzelnen Schritten sollte möglichst wenig Zeit vergehen, sodass die Zellen in keinem Fall zu lange trocken liegen. L.H.16.11.22

